



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

|                                 |                                  |
|---------------------------------|----------------------------------|
| In re Patent Application of     | ) Attorney Docket No.: STURK0007 |
| Hanns-Wolf BAENKLER et al       | ) Confirmation No.: 7997         |
| Serial No.: 10/727,568          | )                                |
| Filed: December 5, 2003         | ) Group Art Unit: 1743           |
|                                 | )                                |
| For: DIAGNOSTIC METHOD BASED ON | ) Examiner: Unassigned           |
| LIPID MESURING PARAMETER        | )                                |
| MODULATIONS/EFFECTOR            | )                                |
| QUOTIENT PROFILES               | )                                |

**SUBMISSION OF CLAIM FOR PRIORITY AND PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

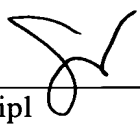
Sir:

It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

| <u>Application No.</u> | <u>Country of Origin</u> | <u>Filing Date</u> |
|------------------------|--------------------------|--------------------|
| 01113712.2             | Europe                   | June 5, 2001       |

Respectfully submitted,

*GRIFFIN & SZIPL, P.C.*

  
\_\_\_\_\_  
Joerg-Uwe Szimpl  
Registration No. 31,799

GRIFFIN & SZIPL, P.C.  
Suite PH-1  
2300 Ninth Street, South  
Arlington, VA 22204

Telephone: (703) 979-5700  
Facsimile: (703) 979-7429  
Email: g&s@szimpl.com  
Customer No.: 24203



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Europäisches  
Patentamt**

**European  
Patent Office**

**Office européen  
des brevets**

**Bescheinigung**

**Certificate**

**Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

**Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°**

01113712.2

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT**

**R C van Dijk**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Anmeldung Nr:  
Application no.: 01113712.2  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 05.06.01  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Baenkler, Hanns-Wolf  
Schlehenweg 2  
91074 Herzogenaurach  
ALLEMAGNE  
Schäfer, Dirk  
Rotbrunnenstrasse 20  
91301 Forchheim  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Diagnostisches Verfahren auf der Grundlage von Lipidmessparameter-Modulations/  
Effektorquotientenprofilen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

G01N33/53  
C12Q1/68  
G06F19/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

### Diagnostisches Verfahren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sicherung oder zum  
5 Ausschuß von Risikokonstellationen, Krankheitszuständen oder  
Prädispositionen dafür, sowie ein Verfahren zur Überwachung  
des Verlaufs von Therapien und zum Auffinden von Wirkstoffen  
zur Behandlung von Krankheitszuständen und zum Auffinden von  
Wirkstoffen, die einen solchen Krankheitszustand auslösen  
10 können, auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/-  
Effektorquotientenprofilen. Ferner betrifft die vorliegende  
Erfindung ein Messinstrument zur Durchführung der genannten  
Verfahren.

15 Das Vorkommen von Lipiden/Eicosanoiden im menschlichen Körper  
und ihre Bedeutung für potentiell viele Körperfunktionen des  
Menschen wurde bereits vor über 100 Jahren beschrieben. Ihre  
Biosynthese sowie deren Beeinflussung durch komplexe als auch  
reine chemische Verbindungen ist bereits seit dem Altertum  
20 bekannt (z.B. die schmerzlindernde Wirkung des Bruchweiden-  
extraktes) und wurde biochemisch seit Mitte des 20. Jahrhun-  
derts immer detaillierter aufgeklärt (1-15). Aber auch das  
Vorkommen der Lipide/Eicosanoide und ihre einflußnehmende  
Wirkung im Tierreich (auch in Amphibien, Insekten und Mikro-  
25 organismen) und den Pflanzen ist bekannt (16-19). Weiterhin  
wachsen die Erkenntnisse über die verschiedenen Lipid/Eico-  
sanoidrezeptoren und möglicher Subtypen zunehmend. Auch sind  
z.T. die Gene und ihre chromosomalen Lokalisationen für eini-  
ge Enzyme des Eicosanoidmetabolismus und der Eicosa-  
30 noidrezeptoren bekannt (20-26).

Der Nachweis von Lipiden/Eicosanoiden erfolgt zur Zeit mit-  
tels verschiedener physikalisch-chemischer und immunologi-  
scher Techniken (z.B. durch Gaschromatographie, Hochdruck-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

2

flüssigkeitschromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie, Radioimmunoassays (RIA), Enzymimmunoassays (EIA)). Diese Methoden unterscheiden sich hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit und Auftrennmöglichkeit verschiedener Lipide/Eicosanoide während des Meßvorgangs sowie des maximalen Probendurchsatzvolumens (27).

Der Nachweis bzw. die Bestimmung von Enzymen, die an der Synthese bzw. dem Abbau von Lipiden/Eicosanoiden beteiligt sind, erfolgt meist nach gelelektrophoretischer Auftrennung der zellulären Proteine durch anschließende Markierung mittels spezifischer Antikörper oder auf intakten Zellen mit radioaktiv oder anderweitig markierten Lipiden/Eicosanoiden bzw. Rezeptorliganden (Agonisten/Antagonisten). Auch ist ein immuncytologischer Nachweis der Enzyme bzw. Rezeptoren mittels immuncytologischer Methoden unter Verwendung geeigneter monoklonaler oder polyklonaler Antikörper möglich. Enzymatische Aktivitätsnachweise bzw. -bestimmungen erfolgen direkt durch Messung des Abbaus geeigneter Enzymsubstrate oder indirekt durch den Nachweis sekundär gebildeter Metaboliten (20, 21, 24, 37, 29-30).

Der Nachweis bzw. die Bestimmung von mRNA für die Enzyme und Rezeptoren, die an der Synthese bzw. dem Abbau von Lipiden/Eicosanoiden oder an deren Bindung beteiligt sind, kann z.B. mittels RT-PCR (engl. »reverse transcriptase polymerase chain reaction«) oder »northern blotting« erfolgen.

Die Lipide/Eicosanoide wurden bisher für klinisch-diagnostische Zwecke nicht bzw. nicht in breitem Umfang genutzt (31, 32), obwohl Analyseverfahren zur Gesamtbestimmung oder auch zur selektiven Bestimmung von bestimmten Eicosanoiden bekannt sind (21-30). Nur für einzelne Eicosanoide, die Prostaglandin-Leukotriene, befindet sich ein Testsystem auf dem Markt



Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

3

(»CAST-Elisa«), das zum Nachweis erhöhter Peptid-Leukotrien-  
spiegel nach in-vitro-Stimulation mit Allergenen in Kombina-  
tion mit generell zellaktivierenden Substanzen (z.B. Komple-  
mentfaktoren oder Cytokinen) dient. Aus der Menge der freige-  
setzten Lipide/Eicosanoide, d.h. der Peptid-Leukotriene, soll  
der Grad der Sensibilisierung der untersuchten (allergischen)  
Patienten abzuleiten sein (32). Auch über die Veränderung der  
Lipid/Eicosanoidspiegel bei verschiedenen Krankheitsbildern  
ist berichtet worden (33-37).

10

Die verschiedenen Autoren weisen in ihren Arbeiten auf die  
Meßbarkeit von veränderten Lipid/Eicosanoidmengen in den von  
ihnen untersuchten Proben hin, und daß viele der untersuchten  
Krankheitsbilder mit erhöhten Lipid/Eicosanoidspiegeln ein-  
hergehen. Grundsätzlich wird aber nicht auf ein Lipid/Ei-  
cosanoidmuster oder -profil, welches sich gegenüber einem  
Normalzustand verändert hat, eingegangen. Auch wird meist nur  
der Ist-Zustand von Lipiden/Eicosanoiden bestimmt. Es wird  
jedoch nicht z.B. die Auswirkung einer Modulation (Stimulati-  
on/Inhibition) der Eicosanoidsynthese des biologischen Mate-  
rials in vitro für diagnostische Zwecke in Erwägung gezogen  
(mit Ausnahme des bereits erwähnten CAST-ELISA). Enzyme und  
Rezeptoren des Lipid/Eicosanoidstoffwechsels wurden nach bis-  
herigem Wissensstand nicht für diagnostische Zwecke, weder im  
Ist-Zustand noch im modulierten Zustand, herangezogen.

25

Aus diesem Stand der Technik ergibt sich die Aufgabe der Er-  
findung.

30

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Sicherung oder  
zum Ausschluß von Krankheitszuständen oder Prädispositionen  
dafür auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Ef-  
faktorquotientenprofilen, bei dem

Schäfer/Baenkler

4

Case 00139.8

(a) eine Probe aus einem zu untersuchenden Organismus entnommen wird,

(b) die Probe aus dem zu untersuchenden Organismus in so viele gleiche Teilproben aufgeteilt wird, daß für jeden Lipidmeßparameter (eine Definition dieses Begriffs wird weiter unten gegeben) A, B, C ... ein Nullwert  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$ , ... in Abwesenheit eines modulierenden Effektors (bzw. Mediators); ein Wert für eine Leitsubstanz (Leitwert)  $A_{max}$ ,  $B_{max}$ ,  $C_{max}$ , ... in Gegenwart eines modulierenden Effektors (bzw. Mediators) (Leitwert, da es auch Fälle gibt (z.B. bei Verwendung eines chemotaktischen Peptids, wie fMLP, N-Formyl-met-Leu-Phe-Phe), bei denen der Meßwert für den weiteren modulierenden Effektor (wie im folgenden angegeben) höher ist als der »Leitwert«); und mindestens ein Wert für eine weitere (in der Regel (aus den oben erläuterten Gründen) intermediäre, d.h. sich unter oder zwischen dem Nullwert und dem Leitwert befindliche) Modulation  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$ , ... in Gegenwart eines weiteren modulierenden Effektors (bzw. Mediators) gemessen werden kann,

(c) für jeden Lipidmeßparameter A, B, C, ... der Probe aus dem zu untersuchenden Organismus

(i) die Quotienten der Meßwerte  $A_{max}/A_0$ ,  $A_2/A_0$ ;  $B_{max}/B_0$ ,  $B_2/B_0$ ;  $C_{max}/C_0$ ,  $C_2/C_0$ ; ... gebildet und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden Werte einer oder mehrerer Normgruppe(n) dividiert werden, wodurch sich normierte Modulationsquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Modulationsquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden, und

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

5

(ii) aus den Nullwerten  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$  ... Quotienten  $A_0/B_0$ ,  $B_0/A_0$ ,  $A_0/C_0$ ,  $C_0/A_0$ ,  $B_0/C_0$ ,  $C_0/B_0$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; aus den Werten für eine maximale Modulation mit einer Leitsubstanz  $A_{\max}$ ,  $B_{\max}$ ,  $C_{\max}$  ... Quotienten  $A_{\max}/B_{\max}$ ,  $B_{\max}/A_{\max}$ ,  $A_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/A_{\max}$ ,  $B_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/B_{\max}$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und aus den Werten für mindestens eine weitere Modulation  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$  ... Quotienten  $A_2/B_2$ ,  $B_2/A_2$ ,  $A_2/C_2$ ,  $C_2/A_2$ ,  $B_2/C_2$ ,  $C_2/B_2$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden Werte einer oder mehrerer Normgruppe(n) dividiert werden, wodurch sich normierte Effektorquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Effektorquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden,

und

(d) eine Risikokonstellation, ein Krankheitszustand oder eine Prädispositionen dafür durch den Vergleich der normierten Modulations- und Effektorquotientenprofile des zu untersuchenden Organismus mit denen einer entsprechenden Untersuchungsgruppe, bei der die interessierende Risikokonstellation, der interessierende Krankheitszustand oder die interessierende Prädisposition vorliegt, gesichert oder ausgeschlossen wird.

Es ist klar, daß bei der Berechnung der Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotienten die Fehlerfortpflanzung berücksichtigt wird. Ferner läßt sich grob sagen, daß ein Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotient auffällig ist, wenn er etwa 5 - 10 % höher oder niedriger als der jeweilige Normwert ist. Als weiteres Entscheidungskriterium zur Abgrenzung Normal/Auffällig kann auch die zweifache Standard-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

6

abweichung  $2\sigma$  des jeweiligen normalen Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotienten dienen. Ist der betreffende Wert gegenüber dem Normwert  $\pm 2\sigma$  verändert, wird er als auffällig angesehen.

5

Es ist klar, daß der Begriff »Normgruppe« bzw. »Untersuchungsgruppe« relativ ist. Die »Normgruppe« kann auch durch den zu untersuchenden einzelnen Organismus selber oder durch Teile desselben (z.B. Gewebe, Körperflüssigkeiten) gebildet werden, z.B. wenn Meßwerte im gesunden Zustand später zur Normierung von Meßwerten in einem akuten Krankheitszustand verwendet werden, oder auch einfach nur um festzustellen, ob irgendwelche Veränderungen eingetreten sind. In analoger Weise gilt dies auch für die »Untersuchungsgruppe«, z.B. wenn Werte im akuten Krankheitszustand nach erfolgter Therapie mit dem Ist-Zustand verglichen werden. Es ist ferner klar, daß die Meßwerte für die Normgruppen und die Untersuchungsgruppen oder die Meßwerte auch nur für einen zu untersuchenden einzelnen Organismus im Normalzustand bzw. im Zustand akuter Erkrankung auch in einer Datenbank gespeichert und bei Bedarf abgerufen und zur Normierung bzw. zum Vergleich herangezogen werden können. Sollten derartige Meßwerte nicht vorliegen, können sie ohne weiteres unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in entsprechenden »normalen« und »pathologischen« Zuständen oder mit entsprechenden »Normgruppen« und »Untersuchungsgruppen« erhoben werden.

Die Bestimmung von Lipidmeßparametern erfolgte bisher nahezu ausschließlich für einzelne Fragestellungen und meist ohne klinisch-diagnostischen Bezug. Sofern überhaupt eine diagnostische Fragestellung besteht (z.B. beim »CAST-ELISA« der Fa. Bühlmann-Laboratories), wird aber nur ein Lipidmeßparameter (hier die Peptid-Leukotriene) bestimmt oder z.B. nur die Grundmenge an Eicosanoid 1 und 2 und evtl. 3 oder En-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

7

zym 1 und 2 etc. oder die Synthese von Eicosanoid 1 erfaßt (32). Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird hingegen insbesondere das Verhältnis verschiedener Lipidmeßparameter zueinander bestimmt (sog. Balancen) und klinisch-diagnostisch ausgewertet, die zu einer Einstufung in Risikonstellungen führt.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotientenprofile ermöglichen die Differenzierung von Krankheitsbildern, das »Monitoring« von Therapien, die Abschätzung von anti-inflammatorischen/pro-inflammatorischen Effekten von Stoffen, Substanzen bzw. Materialien und letztlich auch die inflammatorische Risikoabschätzung bekannter und unbekannter Stoffe/-Stoffgruppen in vitro. Mit Hilfe neuer Technologien (Micro-Multi-Array-Techniken) könnten nunmehr auch kleinste Probenmengen nach dem geschilderten Verfahren analysiert und daraus wichtige Rückschlüsse gezogen werden.

So kann z.B. der Verlauf einer Desensibilisierung gegen Allergene oder eine Desaktivierung gegenüber Acetylsalicylsäure (Aspirin®) direkt gemessen werden, ohne das Wohl des Patienten zu beeinträchtigen. Sowohl die Modulation als auch die Messung finden ex-vivo statt. Eine Messung in vivo ist nicht nötig. Gegenüber dem Stand der Technik beruht das erfindungsgemäße Verfahren auf der Informationsgewinnung durch den Vergleich mindestens zweier Lipidmeßparameter im modulierten (stimulierten/inhibierten) und unmoduliertem Zustand. Eine Risikokonstellation kann nicht über einen Lipidmeßparameter alleine zuverlässig bestimmt werden (beim CAST-ELISA (32) wird z.B. nur 1 Lipidmeßparameter bestimmt), sondern nur durch die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Lipidmeßparameter-Modulations / Effektorquotientenprofile, die

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

8

z.B. das Verhältnis von z.B. Prostaglandinen zu Leukotrienen berücksichtigen.

Weitere vorteilhafte oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (b) die Lipidmeßparameter unter Meßparametern für ungesättigte Fettsäuren, Abbau- und Synthesenzyme für ungesättigte Fettsäuren sowie dafür kodierende Nukleinsäuren (mRNA), und unter solchen für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren sowie dafür kodierende Nukleinsäuren (mRNA) ausgewählt.

Beispielsweise werden die ungesättigten Fettsäuren unter dem Thrombozyten-aktivierenden Faktor (= PAF, engl. »platelet activating factor«) (12) und den Eicosanoiden, z.B. Peptid-Leukotrienen (= pLTs, z.B. LTC4, LTD4, LTE4), Prostaglandin E2 (PGE2), Thromboxan A2 und Thromboxan B2 (= TXB2), ausgewählt.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in dem oben definierten Schritt (b) als maximal modulierender Effektor (Leitsubstanz) Arachidonsäure oder ein chemotaktisches Peptid wie z.B. fMLP verwendet.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in dem oben definierten Schritt (b) als weiterer modulierender Effektor ein Stoff (z.B. Viren, Bakterien oder andere Organismen wie Hefen, Pilze oder Bestandteile davon, Chemikalien im weitesten Sinne wie Lösungsmittel oder Farbstoffe, Allergene im weitesten Sinne, insbesondere auch biologischen Ursprungs, Arzneimittel, Toxine, insbesondere auch biologischen Ursprungs) verwendet, der einen auffälligen

Schäfer/Bacnkler  
Case 00139.8

9

Zustand, z.B. einen Krankheitszustand, hervorrufen kann oder an dessen Entstehung oder Entwicklung beteiligt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich beispielsweise zur  
5 Sicherung oder zum Ausschluß der folgenden Krankheitszustände sowie zur Abschätzung einer Prädisposition für dieselben: Tumore, beispielsweise bronchiale Tumore, cystische Fibrose, Polyposis, z.B. Polyposis nasi et sinuum, Asthma bronchiale, Unverträglichkeiten/Intoleranz gegen Nahrungsmittel, Nah-  
10 rungsmittelzusatzstoffe oder Arzneimittel, z.B. gegen Analgetika wie Acetylsalicylsäure (Aspirin®), Allergien wie Pollen-, Sporen-, Milben-, Wespen- und/oder Bienengiftallergie, etwa als allergisches Asthma, unterschiedliche Entzündungen wie Enzephalitis, Sinusitis, Rhinitis, Neurodermits, Morbus  
15 Crohn, Colitis ulcerosa, Diarrhöen, Infektbewältigung, z.B. an Schleimhäuten, z.B. zur Abwehr bakterieller, viraler oder mykotischer Elemente, z.B. bei bakterieller, viraler oder mykotischer Mucositis, bei Infektanfälligkeit, Gerinnungsstörungen, z.B. Thrombosen, Blutungen oder Thrombophilie.

20

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird/werden zur Bestimmung der Lipidmeßparameter ein oder mehrere, gegebenenfalls markierte(s) Eicosanoid(e), oder der  
Farbstoff 9-Diethylamino-5H-benzo[alpha]phenoxazin-5-on (38-  
25 40) verwendet.

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zur Bestimmung der Lipidmeßparameter immobilisierte  
Sonden verwendet, die ausgewählt sind unter: Antikörpern oder  
30 funktionellen Fragmenten davon gegen Abbau- oder Synthesenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder gegen Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren, Nukleinsäuren, die an Nukleinsäuren hybridisieren, die für Abbau- oder Synthesenzyme von unge-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

10

sättigten Fettsäuren oder für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren kodieren.

5 Eine Sonde ist ganz allgemein ein Erkennungsmolekül oder ein Rezeptor, das/der einen Liganden spezifisch erkennen und binden kann.

10 Unter einem »funktionellen« Fragment eines Antikörpers wird ein Antikörperfragment verstanden, das an ein Antigen binden kann, das aber nicht notwendigerweise auch immunogen sein muß.

15 Geeignete Antikörper werden unter polyklonalen, monoklonalen und Single-chain-Antikörpern ausgewählt.

Geeignete Nukleinsäuren werden unter cDNA, mRNA und Oligonukleotiden ausgewählt.

20 Vorzugsweise bilden die immobilisierten Sonden ein adressierbares Muster auf einer Oberfläche, wodurch ein sogenannter Biochip entsteht.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien von auffälligen Zuständen (z.B. 25 Krankheitszuständen) auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem das oben definierte erfindungsgemäße Verfahren nach der Verabreichung/Applikation (d.h. das zu untersuchende Medikament wird den Probanden bzw. dem Organismus vor der Probenentnahme verabreicht) oder in Gegenwart (d.h. das zu untersuchende Medika- 30 ment wird der Probe nach deren Entnahme aus dem Probanden bzw. Organismus zugesetzt) eines geeigneten Medikaments durchgeführt wird. Dieses Medikament kann als einer der »weiteren modulierenden Effektoren« im Sinne der Erfindung ange-



Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

11

sehen werden. Es können natürlich auch Medikamentenkombinationen verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Auffinden von  
5 Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheitszuständen auf der  
Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotien-  
tenprofilen, bei dem das oben definierte erfindungsgemäße  
Verfahren nach der Verabreichung (d.h. der zu untersuchende  
Kandidatenwirkstoff wird dem Probanden/Organismus vor der  
10 Probennahme verabreicht) oder in Gegenwart (d.h. der zu un-  
tersuchende Kandidatenwirkstoff wird der Probe nach deren  
Entnahme aus dem Probanden/Organismus zugesetzt) eines geeig-  
neten Kandidatenwirkstoff durchgeführt wird. Dieser Kandida-  
tenwirkstoff kann als einer der »weiteren modulierenden Ef-  
15 fektoren« im Sinne der Erfindung angesehen werden. Es können  
natürlich auch Kandidatenwirkstoffkombinationen verwendet  
werden.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zum Auffinden  
20 von Stoffen, die in der Lage sind, einen oben definierten  
Krankheitszustand auszulösen, auf der Grundlage von Lipidmeß-  
parameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem das  
oben definierte erfindungsgemäße Verfahren nach der Verabrei-  
chung/Applikation (d.h. der zu untersuchende Stoff wird dem  
25 Probanden/Organismus vor der Probennahme verabreicht/ appli-  
ziert) oder in Gegenwart (d.h. der zu untersuchende Stoff  
wird der Probe nach deren Entnahme aus dem Proban-  
den/Organismus zugesetzt) eines solchen Stoffes durchgeführt  
wird.

30

Die Erfindung betrifft ferner ein Meßinstrument zur Durchfüh-  
rung der oben definierten erfindungsgemäßen Verfahren, das  
eine Oberfläche aufweist, auf der die oben definierten Sonden  
immobilisiert sind.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

12

Vorzugsweise bilden die Sonden ein adressierbares Muster auf der Oberfläche, wodurch ein sog. Biochip entsteht.

5 Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung und unter Bezugnahme auf konkrete Beispiele detaillierter veranschaulicht.

Allgemein betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Sicherung  
10 oder zum Ausschluß von auffälligen Zuständen z.B. Krankheitszuständen oder Prädispositionen dafür, sowie ein Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien und zum Auffinden von Wirkstoffen zur Behandlung von auffälligen Zuständen z.B. Krankheitszuständen, das auf der Ermittlung des  
15 spontanen, allgemein modulierbaren (d.h. induzierbaren bzw. aktivierbaren/inhibierbaren) oder des speziell provozierten Verhaltens von Geweben und Zellen bezüglich der Synthese, Abgabe, Umsetzung oder des Abbaus von Lipiden wie Eicosanoiden, deren Rezeptoren oder Abbau/Synthesenzyme, und zwar sowohl  
20 absolut als auch im gegenseitigen Verhältnis, beruht.

Im Gegensatz zum Stand der Technik wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zum einen der Grundzustand (der native, nicht modulierte Zustand, der dem Nullwert entspricht) und  
25 zum anderen der modulierte Zustand (z.B. bei Stimulation mit einer Leitsubstanz und mindestens einem weiteren Modulator) von Lipidmeßparametern, z.B. der synthetisierten Lipide/Eicosanoide, der Enzyme der Lipid/Eicosanoidsynthese und/oder der Lipid/Eicosanoidrezeptoren, untersucht. Weiterhin werden mindestens zwei verschiedene Lipidmeßparameter bestimmt, z.B.  
30 Eicosanoide, Eicosanoidenzyme und/oder Eicosanoid-Rezeptoren der selben Probe gleichzeitig analysiert. Hierdurch wird nicht der statische (Grund/Ist)-Zustand erfaßt, sondern zu-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

13

sätzlich die Dynamik/Modulierbarkeit des zu untersuchenden Systems charakterisiert.

Solche »Balanced-Score«-Tests hinsichtlich anderer Parameter sind im Rahmen der medizinischen Diagnostik schon bekannt für die Bewertung des Immunstatus, z.B. bei der Ermittlung der Subpopulationen der T-Lymphozyten (Th1-Th2-Verhältnisse) bei Lepra- oder HIV-Patienten (41,42).

10 Die folgenden Definitionen für verwendete Begriffe gelten für die gesamte Erfindung und in jeder Kombination.

Lipide im Sinne der Erfindung sind beispielsweise gesättigte und insbesondere einfach sowie vorzugsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren natürlicher oder synthetischer Herkunft (mit mind. 16 Kohlenstoffatomen, z.B. 20 Kohlenstoffatomen) sowie deren natürliche und chemisch/physikalisch/technisch induzierten Derivate und Konstrukte.

20 Derivate im Sinne der Erfindung (insbesondere in bezug auf die obigen Lipide) sind biologische/natürliche, chemisch induzierte, physikalisch induzierte/synthetisierte Abkömmlinge der Lipide. Diese können durch enzymatische und/oder nicht-enzymatische Umsetzungsprozesse aus den Lipiden und/oder den  
25 Derivaten entstehen (z.B. Prostaglandin E1, Prostaglandin E2, Prostaglandin E3, Leukotriene, Leukotrien C4 - Leukotrien D4 - Leukotrien D4; HETE (= Hydroxyeisotetraensäure), PAF (engl. »platelet activating factor« = Thrombozyten-aktivierender Faktor).

30 Konstrukte im Sinne der Erfindung (insbesondere in bezug auf die obigen Lipide) sind biologisch und/oder chemisch manipulierte Lipide und/oder Derivate unter Hinzufügung oder Entfernung von chemischen/physikalischen/biologischen Struktu-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

14

ren, also Konstrukte, die natürlicherweise nicht existent sind, sondern willentlich durch gerichtete und/oder ungerichtete Modifikation/Synthese in geeigneten Systemen erzeugt werden (z.B. Enzyminhibitoren, Enzymaktivatoren, insbesondere Inhibitoren und/oder Aktivatoren der Eicosanoidsynthese wie z.B. Manipulatoren der Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen, Rezeptor-Antagonisten, Rezeptor-Agonisten, aber auch für die Detektion geeignete Lipidkonstrukte, die z.B. mittels Fluorometer, oder Luminometer oder Massendifferenzmeßapparaturen nachgewiesen und bestimmt werden können).

Organismen im Sinne der Erfindung sind lebende und/oder nicht lebende vielzellige und/oder einzellige Lebensformen wie Menschen, Tiere, Pflanzen, Pilze, Bakterien und/oder Viren und funktionelle Einheiten dieser Lebensformen wie z.B. (aber nicht erschöpfend) Organe, Gewebe, Zellverbände, Zellen, Zellbestandteile (z.B. Mitochondrien).

Proben im Sinne der Erfindung sind manipulierte oder nicht manipulierte Organismen und/oder Teile von/aus einem/mehreren Organismen mit oder ohne vorherige Manipulation des Organismus und/oder der abgegebenen Strukturen/Substanzen (Lipide), sowie Derivate und/oder Konstrukte des/der modulierten und/oder nicht modulierten Organismus/Strukturen/Substanzen (Lipide), die einer Analyse mit dem Ziel zugeführt werden, direkt oder indirekt mindestens zwei Lipidmeßparameter zu erheben. Als weitere Proben können erfindungsgemäß Nukleinsäuren analysiert werden, die im Zusammenhang stehen mit der Regulation/Expression von Lipiden/Eicosanoiden, wie z.B. Synthese- und Abbauenzyme sowie Rezeptoren.

Lipidmeßparameter im Sinne der Erfindung sind qualitativ und/oder quantitativ bestimmbare Einheiten einer Probe (z.B. Lipidmengen, Eicosanoidmengen, Derivatmengen, Konstruktmengen).

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

15

gen, Enzymmengen, Rezeptormengen, Rezeptordichten, Enzymaktivitäten, Nukleinsäuremengen, Rezeptorbindungsstärken, Ligandenstabilitäten in einer Probe bzw. einem zu definierenden Umfeld).

5

Ein Parameter im Sinne der Erfindung ist eine aus einem oder mehreren Lipidmeßparametern abgeleitete Größe für eine direkte oder indirekte Beurteilung bzw. Beschreibung des Zustandes des Lipidverhältnisses der Probe des untersuchten Organismus, auch um daraus die Folgen für den untersuchten Organismus bzgl. dessen weiterer bzw. zu beginnender Modulation vorherzusagen.

10

Enzyme im Sinne der Erfindung sind Substanzen, die geeignet sind, ein gegebenes Substrat in seiner chemischen/physikalischen/biologischen Art zu verändern und/oder in chemische/physikalische/biologische Prozesse/Reaktionsabläufe einzugreifen, um dadurch die Substrate, insbesondere Lipide im Sinne der Erfindung zu verändern (z.B. Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen, Monooxygenasen).

15

20

Substrate im Sinne der Erfindung sind Stoffe, die durch Enzyme in ihrer/ihren chemischen/physikalischen/biologischen Eigenschaft/en verändert werden können.

25

Rezeptoren im Sinne der Erfindung sind Strukturen, die Lipide, Derivate, Konstrukte aber auch Organismen bzw. Proben im Sinne der Erfindung reversibel und/oder irreversibel binden. Dies können natürlicherweise vorkommende Strukturen (z.B. Proteine) aber auch künstlich erzeugte Strukturen/Konstrukte sein, ohne daß sie eine biologische Funktion besitzen müssen (außer, daß sie Liganden binden). Rezeptoren binden Liganden, wobei die Rezeptoren dieselbe, gleiche und/oder ähnliche chemisch/physikalisch/biologisch Struktur aufweisen können wie

30

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

16

Liganden (d.h. Prostaglandin E2 kann sowohl ein Ligand als auch ein Rezeptor sein, abhängig davon, wie es sich im biologischen Umfeld/im zu untersuchenden Organismus verhält). Ihre chemische/physikalische/biologische Struktur muß dabei nicht  
5 bekannt sein.

Liganden im Sinne der Erfindung sind Strukturen natürlicher und/oder chemisch/physikalisch/biologisch modifizierter natürlicher und/oder künstlich erzeugter Substanzen/Konstrukte,  
10 die geeignet sind, an Rezeptoren im Sinne der Erfindung zu binden, und können selber/gleicher/ähnlicher chemischer/physikalischer/biologischer Struktur sein wie die Rezeptoren (z.B. Proteine, Peptide, gesättigte/ungesättigte Fettsäuren und deren Derivate und/oder Konstrukte, Nukleinsäuren und  
15 oder Nukleinsäurederivate/Nukleinsäurekonstrukte). Ihre chemische/physikalische/biologische Struktur muß dabei nicht bekannt sein.

Ein »Modulator« bzw. »Effektor« im Sinne der Erfindung ist  
20 allgemein ein Stoff oder eine Substanz bzw. Verbindung, die einen oder mehrere Lipidmeßparameter im Sinne der Erfindung verändern kann, z.B. erniedrigen oder erhöhen. Ein Effektor kann also sowohl ein Inhibitor oder Aktivator bzw. ein Antagonist oder Agonist sein.

25

Allgemein umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren folgende Schritte:

(a) Entnahme einer festen, flüssigen oder gasförmigen Probe  
30 (z.B. Zellen, Gewebe, Flüssigkeit, Atem/Atemluft) aus einem Organismus (z.B. Mensch/Tier/Pflanze/Bakterium)

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

17

(b) Bestimmung der absoluten und relativen Mengen der Lipide/Eicosanoide und/oder z.B. der Regulatoren/Effektoren (z.B. Enzyme/Rezeptoren) dieser Lipide/Eicosanoide

5 (c) Bestimmung dieser Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren im nativen (unmodulierten) und/oder modulierten (stimulierten/inhibierten) Zustand

10 (d) Differenzierung einer Risikokonstellation (oder z.B. des Gesundheitszustandes/Krankheitszustandes oder einer Sicherung oder eines Ausschlusses bzw. Diagnose) anhand des Verhältnisses aus (a) bis (c) in Gruppen von Organismen/Patienten und/oder Individuen

15 sowie gegebenenfalls

(e) Erfassung und Bewertung des Lipid/Eicosanoid/Enzyme/Rezeptorenstatus des zu untersuchenden Organismus und Erfassung und Bewertung des Einflusses von therapeutischen Maßnahmen  
20 auf den Organismus (Therapiemonitoring in vitro)

(f) Erfassung und Bewertung (Risikokonstellation) des Einflusses der Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren auf komplexe andere Systeme, um Wechselwirkungen zu erkennen (z.B. Schadstoff-modulierte Bakterien oder Gräserpollen und deren Effekte auf die zu untersuchten Proben des zu untersuchenden Organismus)  
25

Beispiel eines Flußdiagramms der Testdurchführung:

30

1. Probengewinnung
2. Probenaufbereitung
3. Probenexposition (modulierende Substanz/en)
4. Meßprobengewinnung

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

18

5. Meßprobenlagerung

6. Analytik (z.B. durch EIA (engl. »enzyme immuno assay«),  
RIA (engl. »radio-ligand immuno-sorbent assay«), FIA (engl.  
»fluorescence immuno assay«), HPLC (engl. »high pressure li-  
quid chromatography«), GC (engl. »gas chromatography«), IH  
(engl. »immuno histochemistry/immonocytochemistry«), WB  
(engl. western blotting«), NB (engl. northern blotting«), SB  
(engl. southern blotting«), GE (engl. »gelelectrophoresis«),  
PCR (engl. »polymerase chain reaction«))

10 7. Lipidmeßparametererfassung (semiquantitativ/quantitativ)

8. Meßwertverrechnung

9. Aufstellen der Risikokonstellation (ggf. klinische Inter-  
pretation)

15 Das Lipid/Eicosanoidmuster bzw. -profil (verschiedene Lipi-  
de/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren) kann unter Verwendung be-  
liebiger Proben (fest, flüssig, gasförmig) von einem be-  
liebigen Organismus bestimmt werden, wobei die angewendete  
Meß/Analysenmethode keinen besonderen Beschränkungen unter-  
20 liegt und vom Fachmann nach Maßgabe der praktischen Gegeben-  
heiten gewählt wird.

Die Proben können vor der Analyse nicht moduliert oder modu-  
liert worden sein. Die Modulation kann z.B. erfolgen durch  
25 physikalische Mittel (z.B. Wärmestrahlung, radioaktive Strah-  
lung), chemische Stoffe oder Substanzen (z.B. Enzyminhi-  
bitoren/-aktivatoren, Rezeptoragonisten/-antagonisten, spezi-  
fisch oder unspezifisch) oder biologische Stoffe oder Sub-  
stanzen (z.B. Schimmelpilze, Baumpollen, Antikörper), die  
30 spezifisch oder unspezifisch auf das zu untersuchende System  
einwirken.

Die Proben können sein/sich befinden in einer biologischen  
Matrix (Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma, Urin, Stuhl,



Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

19

Atemkondensat oder Liquor; Sekrete der Drüsen von Magen, Darm, Nase, Lunge, Augen; Zellhomogenate; Aerosole; eukaryotische und prokaryotische Zellen, Gewebeverbände und Gewebe) oder in definierten chemischen Lösungen (z.B. Zellkulturmedium, Puffer-/Salz-Lösungen, unphysiologische Lösungen, z.B. in Methanol).

Die Analytik kann quantitativ oder semiquantitativ durchgeführt werden, sie ist jedoch stets geeignet zur Erfassung relativer Unterschiede der Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren/Nukleinsäuren entweder manipulierter Proben für einen dieser Parameter untereinander (z.B. unstimulierte Prostaglandin-E2-Synthese zu stimulierter und/oder inhibierter Prostaglandin-E2-Synthese) und/oder zur Erfassung relativer Unterschiede bestimmter im Einzelfall festzulegender Metaboliten zueinander (z.B. Prostaglandin E2 zu Leukotrien D4 jeweils unmoduliert und moduliert).

Wesentlich ist, daß stets mehr als ein Lipidmeßparameter (z.B. vor Behandlung/nach Behandlung oder unmoduliert/moduliert oder Eicosanoid 1/Eicosanoid 2 oder Enzym 1/Enzym 2, Rezeptor 1/Rezeptor 2, Eicosanoid 1/Rezeptor 1, Eicosanoid 1/Enzym 1, Rezeptor 1/Enzym 1, Rezeptor 1/Enzym 2, etc.) von derselben Probe ermittelt wird, die dann für die weitere Auswertung bereitstehen.

Die Lipide/Eicosanoide werden geeigneterweise z.B. mittels Enzym-Immuno-Assay-Technik erfaßt, da mit dieser Technik viele Meßproben am schnellsten und quantitativ gemessen werden können.

Erfaßt werden z.B. Lipide/Eicosanoide (z.B. Leukotriene, Prostaglandine, Prostanoid, Hydroxyeicosatetraensäuren), Lipid/Eicosanoidrezeptoren, Enzyme der Lipid/Eicosanoidsynthese

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

20

oder die entsprechenden Abbau- oder Regulationsenzyme, sowie dafür kodierende Nukleinsäuren (mRNA).

Zusätzlich zu den bereits bekannten, konventionellen Methoden  
5 (s.o.) soll hier ausdrücklich noch auf die Möglichkeit der Lipid/Eicosanoidanalytik mit Hilfe der Microarray- oder Biochiptechnik eingegangen werden. Die Biochip-Technologie ermöglicht die parallele semiquantitative und quantitative Bestimmung einer Vielzahl der oben genannten Lipidmeßparameter,  
10 wobei die auf dem Biochip befindlichen Sonden zur Bestimmung der Lipid/Eicosanoidmeßparameter thematisch (in Abhängigkeit von der Untersuchungsfragestellung) gruppiert sein können, oder aber auch entsprechend den gesuchten oder gegebenen Erfordernissen (z.B. abhängig vom Krankheitsbild; bei einem  
15 Krankheitsbild ist z.B. pLT und PGE2 wichtig, bei einem anderen pLT und TXB2 oder PGE2 und TXB2 oder PGE2 und PGE2-Rezeptoren und/oder Cyclooxygenase-1) zusammenzustellen bzw. aufzubringen sind. Die physikalischen und/oder chemischen Techniken zur Herstellung von Biochips mit Hilfe bekannter  
20 Verfahren unterliegen dabei keinen besonderen Beschränkungen.

Die Visualisierung der nachzuweisenden bzw. zu bestimmenden Lipide/Eicosanoide/Enzyme/Rezeptoren/Nukleinsäuren kann insbesondere mittels Fluorochromen oder phosphoreszierender oder  
25 bio/chemolumineszierender oder chromogener Substanzen erfolgen.

Die Erfassung der Analysensignale kann z.B. mittels optischer und/oder elektronischer Meßverfahren (z.B. Potentialänderungen, Leitfähigkeitänderungen) erfolgen.  
30

Ziel der Erfindung ist die Bestimmung von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, um auffällige Zustände (wie z.B. Krankheitsbilder) und Gesundheitszustände und

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

21

somit Risikokonstellationen zu charakterisieren, oder z.B. nach anti-entzündlichen Stoffen bzw. Substanzen, z.B. Phytopharmaka, zu suchen (»Drugscreening«), oder um die inflammatorische Potenz bei der Bewertung der Biokompatibilität von implantierbaren Materialien (Produktsicherheit/Patientenschutz) oder die Veranlagung für bestimmte Erkrankungen (Risikokonstellationen) wie Gerinnungsstörungen (z.B. Thrombose, Lungenembolie), Magen-Darm-Erkrankungen (= intestinale Erkrankungen, z.B. Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Ulcus), Nahrungsmittelunverträglichkeiten sowie Entzündungskrankheiten des Gehirns (z.B. Enzephalitis) abschätzen zu können. Weitere Anwendungsmöglichkeiten bestehen in der Geburtshilfskunde, z.B. zur Klärung der Fragestellung, ob ein abnormaler Geburtsverlauf, z.B. wegen abnormaler Wehentätigkeit, zu erwarten ist.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1

Beispielhaft sei hier die Bestimmung des Grundzustandes sowie der stimulierten Zustände von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Peptid-Leukotrienen bei der Analgetika-Intoleranz geschildert.

Humane Leukozyten des peripheren Blutes werden mit Hilfe eines Dextrangradienten vom Plasma getrennt und auf eine definierte Zellzahl (100.000 Zellen/ml) eingestellt. Anschließend erfolgt die Stimulation durch Inkubation der Zellen, z.B. ohne oder unter Zusatz von Arachidonsäure als modulierende Leitsubstanz, oder anti-IgE als modulierender Effektor für eine definierte Zeit (30 Minuten) bei 37°C in Zellkulturmedium (z.B. RPMI 1640). Nach der Sedimentation der Zellen durch

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

22

Zentrifugation für 5 Minuten mit 800 x g bei 4°C wird der zellfreie Überstand gesammelt und kann gegebenenfalls bei -80°C unter Stickstoff oder Argon gelagert werden. Anschließend werden diese Meßproben auf eine mit Prostaglandin E2

5 bzw. Peptid-Leukotrienen beschichtete Polystyrolplatte transferiert und für 18 Stunden bei 4°C unter Zugabe eines anti-Prostaglandin-E2- bzw. anti-Peptid-Leukotrien-Antikörpers inkubiert («kompetitiver Assay»). Nach einem Waschschrift erfolgt eine Inkubation bei 23°C für 2 Stunden mit einem gegen  
10 den ersten Antikörper gerichteten biotinylierten sekundären Antikörper. Nach erneutem Waschen wird mit einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase bei 23°C für 1 Stunde inkubiert, und nach erneutem Waschen wird ein Peroxidasesubstrat hinzugegeben und nach ca. 30 Minuten die optische Dichte mittels eines  
15 Mehrkanal-Photometers bestimmt. Anhand der mitgeführten Standardkurven können nun die Meßwerte quantitativ bestimmt und zur Berechnung der Lipidmeßparameter-Stimulations/Effektorquotientenprofile verwendet werden (ein Beispiel für die Berechnung wird weiter unten gegeben).

20

Ein Beispiel beim Krankheitsbild der Analgetika-Intoleranz ist die verminderte basale Prostaglandin-E2-Synthese (um 20% und mehr), verbunden mit erhöhter basaler Peptid-Leukotrien-Synthese (20% und mehr). Der Quotient Peptid-Leukotrien /  
25 Prostaglandin E2 ist kleiner 10). Die Arachidonsäure-induzierte Prostaglandin-E2-Synthese ist unauffällig und die Arachidonsäure-induzierte Peptid-Leukotrien Synthese ist unauffällig bis leicht erhöht (0-40%), wenn diese Werte mit denen von unauffälligen Personen verglichen werden.

30

Erst die Ermittlung der Lipidmeßparameter-Modulations-/Effektorquotienten ermöglicht eine Differenzierung unterschiedlicher Eicosanoidmuster -bzw. profile, die verschiedenen Risikokonstellationen (wie z.B. bei Patienten mit Asthma bron-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

23

chiale oder Polyposis nasi et sinuum oder Analgetika-induziertem Asthma) zugeordnet werden können.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung von Lipidmeßparametern ist die fluorometrische Messung des Abbaus von ungesättigten Fettsäuren/Arachidonsäure, die mit dem Farbstoff 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on (38) angefärbt werden. Der Farbstoff dringt in lebende Zellen ein und fluoresziert, solange er intrazellulär an ungesättigte Fettsäuren (d.h. solche mit 2 bis mehr Doppelbindungen) binden kann (39-40). Nach der Aktivierung der Zellen, z.B. durch LPS (Lipopolysaccharid) oder Interleukin-1, kommt es zur Aktivierung von Fettsäure-abbauenden Enzymen (z.B. Phospholipase A2(PLA)), wodurch die Fluoreszenz abnimmt. Demgegenüber kann die Fluoreszenz auch erhöht sein, wenn z.B. endogene Arachidonsäure durch PLA aus Zellmembranen ins Cytoplasma freigesetzt wird, die Degradation derselben jedoch unterbleibt.

9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on wurde bisher lediglich für histologische/cytologische Untersuchungen verwendet, nicht jedoch für quantifizierende Experimente eingesetzt.

Bei Organismen mit veränderter Enzymausstattung kommt es nun zu einem veränderten Abbau der Fettsäuren (schneller oder langsamer), was durch eine Erfassung der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten (Kinetik) quantitativ gemessen werden kann.

### 30 Beispiel 2

100.000 Leukozyten/ml werden mit einer  $10^{-5}$  M Lösung von 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on in PBS-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden sie 2

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

24

mal in PBS bei 4°C gewaschen und dann bei 600 x g zentrifugiert und anschließend in eine Reaktionsküvette überführt. Eine Probe wird nun ohne weitere Behandlung fluorimetrisch vermessen (Anregungswellenlänge bei 485 nm, Emissionswellenlänge 570 nm). Eine weitere Probe wird z.B. mit LPS (5mg/ml) stimuliert und fluorimetrisch vermessen. Die Fluoreszenz bei der Proben wird in Zeitabständen von 1 Minute bis zu einer Dauer von 60 Minuten erfaßt. Anschließend kann aus den erhaltenen Werten der Anstieg und der Abfall der Fluoreszenz graphisch aufgetragen werden und die Steigungen der Kurven mittels geeigneter mathematischer Formeln ermittelt werden.

Während der ersten 5-10 Minuten kommt es bei den nicht behandelten Proben zu einem 0-5%igen Anstieg der Fluoreszenz, danach zu einer sigmoid fallenden Fluoreszenz auf 40-60% des Ausgangswertes nach 60 Minuten. Bei den mit LPS-behandelten Proben kommt es innerhalb von 5-10 min zu einem 5-20%igen Anstieg der Fluoreszenz und zu einem 30-80%igen sigmoiden Abfall der Fluoreszenz nach 60 Minuten.

20

Mit den so erhaltenen Werten können nun normierte Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotienten erhoben bzw. berechnet und die erhaltenen Profile mit denen von Proben von Referenz-Organismen verglichen werden. Sofern bereits Archivdaten aus vorherigen Untersuchungen vorliegen, können diese verwendet werden.

25

Durch den Vergleich können dann Risikokonstellationen für den untersuchten Organismus, z.B. hinsichtlich seiner Fähigkeit, ungesättigte Fettsäuren zu metabolisieren, ermittelt werden. Daraus lassen sich dann weitere therapeutische Maßnahmen ableiten.

30

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

25

Diese Methode kann nur in vitro eingesetzt werden. Bisher war eine Anwendung von 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on für quantitative Bestimmungen des nativen und induzierten Abbaus von ungesättigten Fettsäuren/Arachidonsäure zur Bestimmung von Risikokonstellationen noch nicht bekannt.

Es folgt ein konkretes Berechnungsbeispiel für normierte Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotienten. Es wird nochmals darauf hingewiesen, daß die Bestimmung von Meßwerten für eine Normgruppe entfallen kann, wenn bereits entsprechende Archivdaten vorliegen.

### Beispiel 3

15

1) Gewinnung von Leukozyten aus dem peripheren Blut von Untersuchungs-Gruppe 1 / Normgruppe/Untersuchungs-Gruppe 2 mittels Blutabnahme und anschließender Dichtegradientenseparation (3%ige Dextran-Lösung) zur Abtrennung von Plasma und Leukozyten. Die so gewonnenen Leukozyten werden 3 x mit Phosphatpuffer-Lösung (PBS) gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium (RPMI 1650) aufgenommen / resuspendiert, worauf eine Zellzahlkonzentration von 100.000 Zellen/ml eingestellt wird (nur bei diesem Beispiel Untersuchungs-Gruppe 2; eine zweite Gruppe ist für den Test vom Prinzip her nicht notwendig, diese dient hier nur zum besseren Verständnis und als zweite Vergleichsgruppe, und zwar zum einen zur Normgruppe und zum anderen zur Untersuchungs-Gruppe).

2) die Zellen werden zu 3 gleichen Teilen (z.B. 3 x je 1 ml Zellsuspension mit 100.000 Zellen/ml) in Reaktionsgefäße (z.B. Kunststoff- oder Glasgefäße) verteilt.

Die erste Teilprobe wird mit einer Kontroll-Lösung versetzt

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

26

(= ohne weiteren Modulator, = Null- oder Leerwert; Kontroll-Lösung ist das Lösungsmittel, in dem die Modulatoren gelöst werden).

- 5 Die zweite Teilprobe wird mit Arachidonsäure versetzt (Konzentration:  $10^{-5}$  M; = Leitsubstanz).

Die dritte Teilprobe wird mit einer anti-Immunglobulin-E-Lösung (z.B. 1:100 Verdünnung der von der Fa. DAKO kommerziell erhältlichen anti-human-IgE-Lösung, = Modulator oder  
10 Modulationssubstanz) versetzt.

Der Beginn der Exposition / Inkubation mit der Leitsubstanz Arachidonsäure und dem Modulator anti-Immunglobulin-E-Lösung  
15 erfolgt zeitgleich bei z.B.  $37^{\circ}\text{C}$  für z.B. 30 Minuten.

Anschließend erfolgt eine Trennung der Zellen vom Zellkulturmedium, z.B. durch Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und einer Sedimentationsstärke von z.B.  $800 \times g$ . Anschließend wird der so erhaltene Überstand der 3 Teilproben, je Teilprobe getrennt, in  
20 geeigneten Gefäßen (z.B. Kryoröhrchen) gesammelt und bis zur Analyse mittels EIA bei z.B.  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

3) In den Zellkulturüberständen der 3 Teilproben werden  
25 der Gehalt an Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) und Peptid-Leukotrienen (pLT) mittels enzymimmunologischer Assays (Nachweisverfahren) (EIA), die spezifisch für  $\text{PGE}_2$  (= Lipidmeßparameter A) oder pLT (= Lipidmeßparameter B) sind, analysiert und quantifiziert.

30

Aus der ersten Teilprobe erhält man die Wert  $A_0$  (z.B.  $350 \pm 43$  pg/ml  $\text{PGE}_2$ ) und  $B_0$  (z.B.  $120 \pm 9,7$  pg/ml pLT), aus der zweiten Teilprobe erhält man die Werte  $A_{\text{max}}$  (z.B.  $4120 \pm 236$  pg/ml  $\text{PGE}_2$  und  $B_{\text{max}}$  (z.B.  $150 \pm 10,4$  pg/ml pLT),



Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

27

aus der dritten Teilprobe erhält man die Werte  $A_2$  (z.B.  $1830 \pm 143,8$  pg/ml PGE2) und  $B_2$  (z.B.  $83 \pm 5,7$  pg/ml pLT).

Tabelle 1: Meßwerte (in pg/ml):

| Meßparameter | Norm-Gruppe<br>(N) | Untersuchungs-<br>Gruppe 1 (U1) | Untersuchungs-<br>Gruppe 2 (U2) |
|--------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| $A_0$        | $1820 \pm 198$     | $350 \pm 43$                    | $2172 \pm 207$                  |
| $A_{max}$    | $4170 \pm 275$     | $4120 \pm 236$                  | $3976 \pm 245$                  |
| $A_2$        | $2975 \pm 287$     | $1830 \pm 143$                  | $785 \pm 69$                    |
| $B_0$        | $23 \pm 3,5$       | $120 \pm 9,7$                   | $54 \pm 5,8$                    |
| $B_{max}$    | $143 \pm 12,4$     | $150 \pm 10,4$                  | $128 \pm 10,4$                  |
| $B_2$        | $43 \pm 5,7$       | $83 \pm 5,7$                    | $135 \pm 12,7$                  |

4) Aus den so gewonnenen Werten der Teilproben erfolgt nun die Berechnung der Modulationsquotienten für den Lipidparameter A (= PGE2) und den Lipidparameter B (=pLT):

Tabelle 2: Modulationsquotienten:

| Meßparameter  | Norm-Gruppe<br>(n) | Untersuchungs-<br>Gruppe 1 (u1) | Untersuchungs-<br>Gruppe 2 (u2) |
|---------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| $A_{max}/A_0$ | 2,3                | 11,8                            | 1,8                             |
| $A_2/A_0$     | 1,6                | 5,2                             | 0,4                             |
| $B_{max}/B_0$ | 6,2                | 1,3                             | 2,4                             |
| $B_2/B_0$     | 1,9                | 0,7                             | 2,5                             |

15 (auffällige Werte gegenüber der Kontrolle sind in der Tabelle 2, fett markiert)

Die Modulationsquotienten erlauben eine Unterscheidung der Untersuchungsgruppen (u1, u2) von der Normgruppe (n), nicht  
20 aber eine Differenzierung der Untersuchungsgruppen (u1, u2).

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

28

5) Normierung durch Division durch die entsprechenden Modulationsquotienten der Normalgruppe (n).

Tabelle 3: normierte Modulationsquotienten

5

| Meß-<br>parameter | Norm-Gruppe<br>(n) | Untersuchungs-<br>Gruppe 1 (u1) | Untersuchungs-<br>Gruppe 2 (u2) |
|-------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| $A_{\max}/A_0$    | 1 (0,8-1,2)        | 5,1                             | 0,78                            |
| $A_2/A_0$         | 1 (0,5-1,5)        | 3,3                             | 0,25                            |
| $B_{\max}/B_0$    | 1 (0,5-1,2)        | 0,21                            | 0,38                            |
| $B_2/B_0$         | 1 (0,5-1,2)        | 0,37                            | 1,32                            |

(auffällige Werte sind in der Tabelle 3 fett markiert)

- Die normierten Modulationsquotienten erlauben ebenfalls nur eine Unterscheidung der Untersuchungsgruppen (u1, u2) von der Normgruppe (n), nicht aber eine Differenzierung der Untersuchungsgruppen (u1, u2). Die Differenzierung der Untersuchungs-Gruppen ist hier abhängig von der Normgruppe, d.h. es können auch zwei oder mehr sonst ähnliche Patienten-Gruppen differenziert werden, z.B. wenn eine »gesunde« Normgruppe nicht erstellt werden kann oder wenn geklärt werden soll, ob sich die beiden Untersuchungsgruppen unterscheiden.

6) Effektorquotienten (Berechnung wie oben)

Tabelle 4: Effektorquotienten (PGE/pLT):

| Meß-<br>parameter   | Norm-Gruppe<br>(n) | Untersuchungs-<br>Gruppe 1 (u1) | Untersuchungs-<br>Gruppe 2 (u2) |
|---------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| $A_0/B_0$           | 80,4               | 2,9                             | 40,2                            |
| $A_{\max}/B_{\max}$ | 29,2               | 27,5                            | 31,1                            |
| $A_2/B_2$           | 69,2               | 22,1                            | 5,8                             |

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

29

(auffällige Werte gegenüber der Kontrolle sind in der Tabelle  
4 **fett** markiert)

Die Effektorquotienten erlauben die Differenzierung der bei-  
5 den Untersuchungs-Gruppen ( $u_1$ ,  $u_2$ ) mit Hilfe des zweiten Mo-  
dulators (= anti-IgE). Außerdem werden die Unterschiede der  
beiden Untersuchungs-Gruppen gegenüber der Normgruppe ( $n$ )  
deutlicher.

10 7) Normierte Effektorquotienten (Berechnung wie oben)

Tabelle 5: Normierte Effektorquotienten

| Meß-<br>parameter | Norm-Gruppe<br>(n) | Untersuchungs-<br>Gruppe 1 ( $u_1$ ) | Untersuchungs-<br>Gruppe 2 ( $u_2$ ) |
|-------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| $A_0/B_0$         | 1 (0,5-1,2)        | <b>0,036</b>                         | <b>0,50</b>                          |
| $A_{max}/B_{max}$ | 1 (0,9-1,1)        | 0,941                                | 1,065                                |
| $A_2/B_2$         | 1 (0,2-1,2)        | 0,319                                | <b>0,084</b>                         |

15 (auffällige Werte gegenüber der Kontrolle sind in der Tabelle  
5 **fett** markiert)

Die normierten Effektorquotienten ermöglichen die klare Dif-  
ferenzierung der beiden Untersuchungs-Gruppen ( $u_1$ ,  $u_2$ ) gegen-  
20 über der Normgruppe ( $n$ ), sowie die Differenzierung der beiden  
Untersuchungs-Gruppen gegeneinander. Hier sind die angegebe-  
nen Werte bedingt abhängig von der gewählten Normgruppe, es  
könnte aber auch eine andere Normgruppe ( $n-x$ ) gewählt werden.  
Dies kann z.B. erfolgen, um mehrere Untersuchungsgruppen ( $u_1$ ,  
25  $u_2$ ,  $u_3$ ,  $u_4$ ) gegeneinander zu differenzieren. Wenn keine  
»Normgruppe« bereitsteht oder erstellt werden kann, kann eine  
Untersuchungsgruppe ( $n_4$ ) als »Normgruppe« ( $n-x$ ) ausgewählt  
werden. Diese Alternative kann auch angewendet werden, wenn  
z.B. gegenüber »behandelter« ( $b_1$ ) und »anders behandelter«

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

30

(b2) und/oder »unbehandelter« (b3 = n-x) Gruppe differenziert werden soll.

8) Anmerkung: Die Meßwerte der pLT-Bestimmungen müssen gegebenenfalls mit einem »Ausgleichungsfaktor« (kann experimentell bestimmt werden und liegt zwischen 5 und 100) korrigiert werden, wodurch sich die daraus abgeleiteten/bestimmten Werte relational verändern würden.

9) Schlußfolgerung aus den erhaltenen Ergebnissen:

Die Untersuchungsgruppe 2 wird in die Risikokonstellation 2 eingeteilt, d.h. es liegt eine Analgetika-Intoleranz ohne eine allergische Komponente vor, weshalb eine Desaktivierung gegenüber nichtsteroidalen Analgetika anzuraten ist, und nichtsteroidale Antiphlogistika sollten von Personen dieser Gruppe bis zur erfolgreichen Durchführung der Desaktivierung gemieden werden. Die Untersuchungsgruppe 1 wird der Risikokonstellation 1 zugeordnet, d.h. es liegt eine Analgetika-Intoleranz mit einer deutlichen allergisch-bedingten Komponente vor, weshalb bei Personen dieser Gruppe eine Allergie-Austestung vorgenommen werden sollte mit gegebenenfalls anschließender Desensibilisierung. Erst danach könnte eine Desaktivierung gegenüber Analgetika sinnvoll sein.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

31

## LITERATUR

## 1) Hirschberg V.G.S.

Mittheilung über einen Fall von Nebenwirkungen des Aspirin.

Dt Med Wochenschr 1902;28:416.

5

## 2) von Euler U.S.

Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes.

Klin Wschr 1935;14:1182-1186.

10

## 3) Hanahan D.J.

Platelet activating factor: A biological active phosphoglyceride.

Ann Rev Biochem 1986;55:483-509.

15

## 4) Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B.

Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxidase.

Proc Natl Acad Sci USA 1975;72:2994-2998.

20

## 5) Vane J.R.

Inhibition of prostaglandin biosynthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.

Nature (New Biol) 1971;231:232-235.

25

## 6) Bergström S.

Prostaglandines: Members of a new hormonal system.

Science 1967;157:382-390.

30

## 7) Samuelsson B.

Some recent advances in leukotriene research.

Adv Exp Med Biol 1997;433:1-7.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

32

8) Samuelsson B., Dahlen S.-E., Lindgren J.A. Rouzer C.A.,  
Serhan C.N.

Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and bio-  
logical effects.

5 Science 1987;237:1171-1176.

9) Holzman J.Y.

Arachidonic acid metabolism.

Am Rev Respir Dis 1991; 143:188-203.

10

10) Smith W.L.

The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action.

Biochem J 1989; 259:315-324.

15

11) Fradin A., Zirrolli J.A., Maclouf J., Vausbinder L.,  
HENSON P.M., Murphy R.C.

Platelet-activating factor and leukotriene biosynthesis in  
whole blood - a model for the study of transcellular arachido-  
nic metabolism.

20

J Immunol 1989;143:3680-3685.

12) Smith D.L & Willis A.L.

A suggested shorthand nomenclature for the eicosanoids.

Lipids 1987;22:983-987.

25

13) Corey E.J., Niwa H., Falck J.R., Mioskowski C., Arai Y.,  
Marfat A.

Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids.

Adv Prostaglandin Thromboxane Res 1980;6:19-25.

30

14) Willis A.L. & Smith D.L.

Metabolism of arachidonic acid.

in: The handbook of immunopharmacology. Lipid mediators, ed.:

Cunningham F.M., Academic Press, London, 1994:1-32.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

33

15) Slater T.F. & McDonald-Gibson R.G.

Introduction to the eicosanoids.

in: Prostaglandins and related substances, eds.: Benedetto C,

5 McDonald-Gibson RG, Nigam S, Slater TF, IRL Press, Oxford,

1987:1-4.

16) Rowley A.F., Kuhn H., Schewe T.

Eicosanoids and related compounds in plants and animals.

10 PoPrinceton University Press, Princeton, 1998.

17) Stanley-Samuelson D.W..

Physiological role of prostaglandins and other eicosanoids in  
invertebrates.

15 Biol Bull 1987;173:92-109.

18) Bell M.V., Henderson R.J., Sargent J.R.

The role of polyunsaturated fatty acid in fish.

Comp Biochem Physiol 1986;85B:711-719.

20

19) Vick B.A.

Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway.

Chapter 5

in: Lipid metabolism in plants.

25 ed: Moore T.S.

CRC Press, Boca Raton 1993:167-191.

20) Dennis E.A.

Diversity of group types, regulation, and function of phos-  
30 pholipase A2.

J Biol Chem 1994;269:13057-13063.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

34

21) Creminon C., Habib A., Macclouf J., Pradelles P., Grassi

Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical cells using specific immunometric enzyme immunoassays. Biochim Biophys Acta 1995;1254:341-348.

22) O'Neil G.P. & Ford-Hutshinson A.W.

Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase 2 in human tissue. FEBS Lett 1993;330:156-160.

23) Kennedy I., Coleman R.A., Humphrey P.P.A., Levy H.P., Lumley P.

Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification Prostaglandins, 1982: 24:667-689.

24) DeWitt D.L. & Meade E.A.

Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isoenzymes. Arch Biochem Biophys 1993;306:94-102.

25) Gardiner P.J., Abram T.S., Tudhope S.R., Cuthbert N.J., Norman P., Brink C.

Leukotriene receptors and their selective antagonists. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 1994;2:49-61.

26) Hong J.L. & Lee L.-Y.

Cigarette smoke-induced bronchoconstriction: causative agents and role of thromboxane receptors. J Appl Physiol 1995;78:2260-2266.



Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

35

27) Coleman R.A., Smith W.L., Narumiya S.  
Classification of the prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes.  
Pharmacol rev. 1994;46:205-229.

5

28) Taylor G.W. & Wellings R.

Measurements of fatty acids and their metabolites.  
in: Lipid mediators  
ed.: Cunningham F.M.

10 Accademic Press, London 1994:33-60.

29) Kulmacz R.J., & Lands W.E.M.

Cyclooxygenase: Measurement, purification and properties.

in: Prostaglandins and related substances.

15 eds.: Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater  
T.F.

Oxford University Press, Oxford 1989:209-228.

30) Schewe T., Kühn H., Rapoport S.M.

20 Lipoxygenases: measurement, characterization, and properties.

in: Prostaglandins and related substances.

eds.: Benedetto C., McDonald-Gibson R.G., Nigam S., Slater  
T.F.

Oxford University Press, Oxford 1989:229-242.

25 31) Vilaseca J., Salas A., Guarner F., Rodriguez R., Malagelada J.R.

Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis  
in the course of experimental inflammatory colitis.

30 Gastroenterology 1990;98:269-277.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

36

32) De Weck A.L., Stadler B.M., Urwyler A., Wehner H.U.,

Bühlmann R.P.

Cellular antigen stimulation test (CAST) - A new dimension in  
allergy diagnostics.

5 Allergy Clin Immunol News 1993;5:9-14.

33) Baenkler H.-W., Schäfer D., Rosemann W.

Eicosanoids from biopsies of normal and polypous nasal muco-  
sa.

10 Rhinology 1996;34:166-170.

34) Schäfer D., Lindenthal U., Wagner M., Bölskei P.L.,

Baenkler H.W.

Effect of prostaglandin E2 on eicosanoid release by human  
15 bronchial biopsy specimens from normal and inflamed mucosa.

Thorax 1996;51:919-932.

35) Sauer S.K., Schäfer D., Kress M., Reeh P.W.

Stimulated prostaglandin E2 from rat skin, in vitro.

20 Life Science 1998;62:2045-2055.

36) Schäfer D., Schmid M., Göde U., Baenkler H.-W.

Dynamics of eicosanoids in peripheral blood cells during  
bronchial provocation in aspirin-intolerant asthmatics.

25 Eur Respir J 1999;13:638-646.

37) Westcott J.Y.

The measurement of leukotrienes in human fluids.

Clin Rev Allergy Immunol 1999;17:153-177.

30

38) Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D.

Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular li-  
pid droplets.

J Cell Biol. 1985;100:965-973.

Schäfer/Baenkler

37

Case 00139.8

39) Dvorack A.M., Dvorak H.F., Peters S.P., Shulman E.S., Mac  
Glashan D.W., Pyne K., Harvey V.S., Galli S.J., Lichtenstein  
L.M.

15 Lipid bodies: cytoplasmatic organelles important to arachido-  
nate metabolism in macrophages and mast cells.

J Immunol 1983;131:2965-2976.

40) Weller P.F. & Dvorack A.M.

10 Arachidonic acid incorporation by cytoplasmatic lipid bodies  
of human eosinophils.

Blood 1985;65:1269-1274.

41) Erdmann E.

15 Klinische Kardiologie.

Springer Verlag, Berlin, 2000.

42) Adler G., Beglinger C., Müller-Lissner S., Schmigel W.

Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel.

20 Springer Verlag, Berlin, 2000.

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

38

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Sicherung oder zum Ausschluß von Krankheitszuständen oder Prädispositionen dafür auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektor-quotientenprofilen, bei dem

(a) eine Probe aus einem zu untersuchenden Organismus entnommen wird,

(b) die Probe aus dem zu untersuchenden Organismus in so viele gleiche Teilproben aufgeteilt wird, daß für jeden Lipidmeßparameter A, B, C ... ein Nullwert  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$ , ... in Abwesenheit eines modulierenden Effektors; ein Wert für eine Leitsubstanz (Leitwert)  $A_{max}$ ,  $B_{max}$ ,  $C_{max}$ , ... in Gegenwart eines modulierenden Effektors/einer modulierenden Leitsubstanz; und mindestens ein Wert für einen weiteren Modulator  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$ , ... in Gegenwart eines weiteren modulierenden Effektors gemessen werden kann,

(c) für jeden Lipidmeßparameter A, B, C, ... der Probe aus dem zu untersuchenden Organismus

(i) die Quotienten der Meßwerte  $A_{max}/A_0$ ,  $A_2/A_0$ ;  $B_{max}/B_0$ ,  $B_2/B_0$ ;  $C_{max}/C_0$ ,  $C_2/C_0$ ; ... gebildet und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden Werte einer oder mehrerer Normgruppe(n) dividiert werden, wodurch sich normierte Modulationsquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Modulationsquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden, und

Schäfer/Baenkler

39

Case 00139.8

(ii) aus den Nullwerten  $A_0$ ,  $B_0$ ,  $C_0$  ... Quotienten  $A_0/B_0$ ,  $B_0/A_0$ ,  $A_0/C_0$ ,  $C_0/A_0$ ,  $B_0/C_0$ ,  $C_0/B_0$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; aus den Werten für eine Leitsubstanz  $A_{\max}$ ,  $B_{\max}$ ,  $C_{\max}$  ... Quotienten  $A_{\max}/B_{\max}$ ,  $B_{\max}/A_{\max}$ ,  $A_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/A_{\max}$ ,  $B_{\max}/C_{\max}$ ,  $C_{\max}/B_{\max}$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und aus den Werten für mindestens eine weitere Modulation  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$  ... Quotienten  $A_2/B_2$ ,  $B_2/A_2$ ,  $A_2/C_2$ ,  $C_2/A_2$ ,  $B_2/C_2$ ,  $C_2/B_2$  ... in beliebiger Kombination gebildet werden; und anschließend die für den zu untersuchenden Organismus erhaltenen Werte durch die entsprechenden für die Normgruppe(n) erhaltenen Werte dividiert werden, wodurch sich normierte Effektorquotienten ergeben, die in ihrer Gesamtheit ein normiertes Effektorquotientenprofil für den zu untersuchenden Organismus bilden,

und

(d) eine Risikokonstellation, ein Krankheitszustand oder eine Prädispositionen dafür durch den Vergleich der normierten Modulations- und Effektorquotientenprofile des zu untersuchenden Organismus mit denen einer entsprechenden Untersuchungsgruppe, bei der die interessierende Risikokonstellation, der interessierende Krankheitszustand oder die interessierende Prädisposition vorliegt, gesichert oder ausgeschlossen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in Schritt (b) die Lipidmeßparameter unter Meßparametern für ungesättigte Fettsäuren, Abbau- und Synthesenzyme für ungesättigte

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

40

Fettsäuren, sowie dafür kodierende Nukleinsäuren, und unter solchen für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren, sowie dafür kodierende Nukleinsäuren, ausgewählt werden.

5

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die ungesättigten Fettsäuren unter dem Thrombozyten-aktivierenden Faktor und den Eicosanoiden ausgewählt werden.

10

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Eicosanoide unter den Peptid-Leukotrienen, Prostaglandin E2, Thromboxan A2 und Thromboxan B2 ausgewählt werden.

15

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) als stimulierende Leitsubstanz der Effektor Arachidonsäure oder ein chemotaktisches Peptid verwendet wird.

20

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei in dem in Anspruch 1 definierten Schritt (b) als weiterer modulierender Effektor ein Stoff verwendet wird, der einen Krankheitszustand hervorrufen kann oder an dessen Entstehung oder Entwicklung beteiligt ist.

25

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Krankheitszustand ausgewählt ist unter Tumoren, cystischer Fibrose, Polyposis, Asthma bronchiale, einer Unverträglichkeit, Gerinnungsstörungen, Infektbewältigung und einer Entzündung.

30

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Unverträglichkeit eine Nahrungsmittel-, Nahrungsmittelzusatzstoff- oder Arzneimittelunverträglichkeit oder eine Allergie ist, und wobei die Gerinnungsstörungen die Basis für Throm-

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

41

bosen oder Blutungen oder Thrombophilie darstellen, und wobei die Infektbewältigung eine Abwehr bakterieller, viraler oder mykotischer Elemente, z.B. bei bakterieller, viraler oder mykotischer Mucositis, ist, und wobei die Entzündung Enzephalitis, Sinusitis, Rhinitis, Neurodermitis, Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Arzneimittelnverträglichkeit eine Analgetikaunverträglichkeit und die Allergie eine Pollen-, Sporen-, Milben-, Wespen- oder Bienengiftallergie ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Analgetikaunverträglichkeit Acetylsalicylsäureunverträglichkeit ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, wobei zur Bestimmung der Lipidmeßparameter ein oder mehrere, gegebenenfalls markierte(s) Eicosanoid(e) oder der Farbstoff 9-Diethylamino-5H-[alpha]phenoxazin-5-on verwendet wird/werden.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, wobei zur Bestimmung der Lipidmeßparameter immobilisierte Sonden verwendet werden, die ausgewählt sind unter Antikörpern oder funktionellen Fragmenten davon gegen Abbau- oder Syntheseeenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder gegen Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren; Nukleinsäuren, die an Nukleinsäuren hybridisieren, die für Abbau- oder Syntheseeenzyme von ungesättigten Fettsäuren oder für Rezeptoren für ungesättigte Fettsäuren kodieren.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Antikörper unter polyklonalen, monoklonalen und Single-chain-Antikörpern

Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

42

pern, und die Nukleinsäuren unter cDNA, mRNA und Oligonukleotiden ausgewählt werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die immobilisierten Sonden ein adressierbares Muster auf einer Oberfläche bilden.

15. Verfahren zur Überwachung des Verlaufs von Therapien von Krankheitszuständen auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 nach der Verabreichung oder in Gegenwart eines geeigneten Medikaments durchgeführt wird.

16. Verfahren zum Auffinden von Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheitszuständen auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 nach der Verabreichung oder in Gegenwart eines Kandidatenwirkstoffs durchgeführt wird.

17. Verfahren zum Auffinden von Stoffen, die in der Lage sind, einen Krankheitszustand gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10 auszulösen, auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektorquotientenprofilen, bei dem ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 nach der Verabreichung/Applikation oder in Gegenwart eines solchen Stoffes durchgeführt wird.

18. Meßinstrument zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17, das eine Oberfläche aufweist, auf der in Anspruch 12 oder 13 definierte Sonden immobilisiert sind.



Schäfer/Baenkler  
Case 00139.8

43

19. Meßinstrument nach Anspruch 18, wobei die Sonden ein adressierbares Muster auf der Oberfläche bilden.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sicherung oder zum  
5 Ausschluß von Risikokonstellationen, Krankheitszuständen oder  
Prädispositionen dafür, sowie ein Verfahren zur Überwachung  
des Verlaufs von Therapien und zum Auffinden von Wirkstoffen  
zur Behandlung von Krankheitszuständen und zum Auffinden von  
Stoffen, die einen solchen Krankheitszustand auslösen können,  
10 auf der Grundlage von Lipidmeßparameter-Modulations/Effektor-  
quotientenprofilen. Ferner betrifft die Erfindung ein Meßin-  
strument zur Durchführung der obigen Verfahren.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK** (USPTO,